



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA – PIBIC

**Análise do Polimorfismo genético rs1803274 (gene
BChE) em trabalhadores rurais**

Área do conhecimento: Ciências da Saúde
Subárea do conhecimento: Análise toxicológica
Especialidade do conhecimento: Genética

Relatório Final
Bruno Luiz Nascimento Souza
Período da bolsa: de (agosto de 2017) a (julho de 2018)

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/COPES
PIBIC/CNPq

SUMÁRIO

1. Introdução-----	4
2. Objetivos-----	6
3. Metodologia-----	6
4. Resultados e discussões-----	7
5. Conclusões-----	9
6. Perspectivas-----	9
7. Referências bibliográficas-----	10
8. Outras atividades-----	11

RESUMO

Introdução: A variabilidade genética individual tem impacto na resposta do organismo à exposição/absorção, bem como na regulação da resposta e metabolização e tempo atuação de determinadas substâncias. As colinesterases atuam como mediadores do processo de intoxicação por organofosforado (OF). Monitorar as atividades destas enzimas e conhecer a variabilidade genética da população agrícola é de grande importância na avaliação de possíveis grupos de risco para intoxicação por OF.

Objetivo: Descrever a frequência do polimorfismo genético rs1803274 (gene BChE) em trabalhadores rurais dos municípios de Lagarto, Salgado e Boquim-SE. **Metodologia:** A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência do SNP foi o PCR em tempo real. A primeira etapa, a extração e purificação do DNA foi realizada pela técnica de micropartículas magnéticas, através de automação, com o equipamento M2000 sp da ABBOTT®. Posteriormente, foi realizada a genotipagem das amostras, utilizando primers e sondas específicos para o SNP pesquisado. Os desenhos dos primers previamente desenvolvidos pela empresa Thermo Scientific®. Para teste de associação das variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. Para os testes dos modelos genéticos a Regressão Logística Binária foi utilizada no Modelo Aditivo e o Teste Exato de Fisher e teste Qui-Quadrado nos Modelos Dominante e Recessivo ($p < 0,05$).

Resultados: Foram genotipados 413 trabalhadores rurais. O polimorfismo no gene da BChE (rs1803274) apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados foram representados em valores percentuais de frequência dos genótipos. A maioria dos integrantes desta pesquisa não apresentou o alelo polimórfico, correspondendo a 64,9% (268) de genótipos apenas com o alelo selvagem. A atividade da BChE foi demonstrada, porém, não houve diferença estatística entre este parâmetro e o polimorfismo rs 1803274. O alelo mais frequente foi o C, tendo a maior parte dos trabalhadores apresentado este em homozigose (268/64,9%). **Conclusão:** A maioria dos trabalhadores não apresentou o alelo polimórfico para o SNP estudado, sendo que 64,9% dos genótipos apresentaram apenas o alelo selvagem. Os resultados de frequência alélica encontrados reforçam a hipótese do caráter dominante do alelo C.

Palavras-chaves: Organofosforado; Polimorfismos Genéticos; Butirilcolinesterase

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas, principalmente quando usados excessivamente, de maneira inadequada e sem orientação, além de oferecerem riscos à saúde do trabalhador rural e do meio ambiente, podem causar prejuízos à saúde da população em geral, em razão das intoxicações causadas pela ingestão de alimentos e de água contaminados (LOPES, 2006). A via ocupacional se relaciona à contaminação dos indivíduos que manipulam os pesticidas (DYMINSKI, 2006).

A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de consequências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural, podendo ser algumas vezes fatais. A exposição ocupacional e/ou ambiental pode originar intoxicações agudas ou crônicas. Há produtos que são extremamente tóxicos, podendo ocorrer intoxicação de forma leve, moderada ou grave e com sinais claros e objetivos: náuseas, vômitos, convulsões, contrações musculares, dores de cabeça, desmaios, sangramentos convulsões, mal estar, sonolência, fraqueza, dor de estômago e dificuldade em respirar. Já as intoxicações crônicas são caracterizadas pelo surgimento tardio dos sintomas: dermatites de contato, lesões renais e hepáticas, alterações hematológicas, efeitos neurotóxicos retardados, alterações nos cromossomos, doença de Parkinson, cânceres e teratogêneses (DOMINGUES, et al. 2004; STOPELLI, 2005).

Entre os agrotóxicos que mais causam preocupação em termos de saúde humana, por serem os mais utilizados, estão os compostos pertencentes à categoria dos organofosforados que são inibidores da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase com variado grau de toxicidade em seres humanos.

Os compostos organofosforados são lipossolúveis, o que faz com que se acumulem nos organismos vivos, portanto, altamente tóxicos e agem principalmente inibindo a enzima colinesterase, impedindo a passagem de novos impulsos nervosos. Constituem uma importante classe de inseticidas, representados por compostos como: dimetoato, o metamidófos e o acefato. No ambiente, são facilmente degradados (SANCHES, et al., 2003).

A determinação das atividades das colinesterases, enzimas presentes em nosso organismo que desempenham papel fundamental na transmissão dos impulsos nervosos tem grande significado para o diagnóstico e acompanhamento das intoxicações agudas. É importante ressaltar que a análise da atividade das colinesterases não deve ser usada de maneira isolada, sendo útil quando usada como exame auxiliar, tanto diagnóstico clínico quanto para as ações de vigilância e acompanhamento clínico.

A variabilidade genética individual tem impacto na resposta do organismo à exposição/absorção, bem como na regulação da resposta e metabolização e tempo de atuação da substância. A toxicogenômica é a área de pesquisa que toma por base o tempo de efeito das drogas sobre a expressão do gene, e é capaz de prever efeitos tóxicos mais cedo do que as tecnologias tradicionais, analisando as alterações nos biomarcadores do genoma que precedem os danos histológicos em órgãos.

Alguns dos genes marcadores são específicos para determinados órgãos, e alguns deles são indicadores gerais de toxicidade em múltiplos órgãos (FABIAN G, et al. 2011). Além do mais, o conhecimento humano de vias metabólicas poderá fornecer informações que auxiliam no processo de avaliação de riscos (ROSE RL, et al. 2005). Os genes alvo se baseiam em marcadores genéticos selecionados que codificam proteínas com funções diferentes, tais como: proteínas de resposta de fase aguda, do estresse inflamatório oxidativo, processos metabólicos, a regulação do ciclo celular/apoptose e enzimas que estão envolvidas e processos de desintoxicação.

Levando-se em conta o alto grau de variabilidade genética que a população em geral possui, e que se manifesta nas diferentes características fenotípicas apresentadas, temos que a genética se apresenta como fator determinante para os indivíduos.

É importante ressaltar que, apesar da relevância no mecanismo de metabolização da acetilcolina residual, e de também ser inibida pelos OF, para estudos genéticos, não se torna tão viável as análises com os SNPs do gene

que codifica a enzima acetilcolinesterase (AChE). Não pela ausência de variantes, pois elas existem. Ocorre que, de acordo com o banco de dados genéticos ExAC – Exome Aggregation Consortium – que lista as alterações na sequência do DNA observadas e as frequências em diversas populações no mundo, as variantes da enzima AChE são raras, e só ocorrem em heterozigose. Além disso, quando presentes em casos raros, não estão correlacionadas com perda de função da enzima, nem há relatos de patologias que tenham como causa a presença deste polimorfismo (LOCKRIDGE et al, 2016).

Para a enzima BChE, o SNP escolhido foi o rs1803274, foi selecionado levando em consideração a frequência com que ele aparece na população e, conseqüentemente, a variedade de literatura pré-existente nos bancos de dados internacionais (PUBMED), caracterizando o perfil dos pacientes que apresentam este polimorfismo como indivíduos possivelmente susceptíveis ou vulneráveis (LOCKRIDGE et al, 2016, BONO et al, 2014; LANDO et al, 2003).

OBJETIVO

Descrever a frequência do polimorfismo genético rs1803274 (gene BChE) em trabalhadores rurais dos municípios de Lagarto, Salgado e Boquim-SE.

METODOLOGIA

A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência do SNP será o PCR em tempo real. A primeira etapa, a extração do DNA, consiste na lise das membrana biológicas e purificação do material genético, e será realizada pela técnica de micropartículas magnéticas, através de automação, com o equipamento m2000 sp ABBOTT®. Nesse tipo de extração, após a solução de lise ser adicionada a amostra, o DNA é liberado do envoltório nuclear, e se liga às partículas magnéticas, possuem afinidade pelo mesmo. Um sistema de ímã prende as partículas, de forma que as lavagens que o aparelho realiza na solução retiram todas as outras estruturas presentes na célula lizada, purificando a amostra de qualquer contaminante ou interferente. Em seguida,

uma substância eluente quebra a ligação entre o DNA partículas magnéticas, e o material genético, então, está purificado e pronto para a segunda etapa.

Uma vez extraído e purificado, a próxima etapa foi a genotipagem das amostras, utilizando primers e sondas específicos para o SNP pesquisado. Os desenhos primers previamente desenvolvidos pela empresa Thermo Scientific®, e serão adquiridos juntamente com as respectivas sondas, também previamente padronizada.

Os primers marcam a região de interesse que se deseja pesquisar no DNA estudado, possuindo uma sequência iniciadora para a direção 5' – 3' para o primer Forward outra para o primer Reverse, na direção 3'-5', já que as fitas têm que possuir nucleotídeos que sejam complementares. Uma vez reconhecendo a região complementar no DNA presente na amostra, o primer se liga à mesma, e a DNA polimerase, enzima responsável pela replicação do material genético, inicia o procedimento de duplicação das fitas.

O fundamento da técnica de PCR em tempo real consiste justamente em simular in vitro a replicação do DNA que ocorre in vivo, com oscilações de temperatura promove a desnaturação da fita dupla de DNA ($\pm 95^{\circ}\text{C}$), formando duas fitas simples, o anelamento dessas fitas com os primers e a posterior extensão ($\pm 60^{\circ}$ onde uma fita gerará duas outras fitas, e a cada ciclo, essa replicação ganha um caráter logarítmico. Ao final de 40 ciclos, teremos milhares de cópias de DNA. replicação, um sinal fluorescente é liberado pela sonda, que está acoplada ao primer, e esse sinal é captado pelo equipamento e transformado em informação clínica que no caso deste estudo, é representada pela presença dos genótipos estudados. O equipamento utilizado foi o 7500 Standard da Thermo Scientific®.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram genotipados 413 trabalhadores rurais dos municípios de Lagarto, Salgado e Boquim-SE. O polimorfismo no gene da BChE (rs1803274) apresentou-

se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados da genotipagem dos trabalhadores rurais foram representados em valores percentuais de frequência dos genótipos. Com relação ao rs1803274, SNP da BChE, a maioria dos integrantes desta pesquisa não apresentou o alelo polimórfico, correspondendo a 64,9% (268) de genótipos apenas com o alelo selvagem.

A comparação entre as frequências alélicas da amostra e da população Yorubá, escolhida como referência pelo perfil de ancestralidade (PENA et al., 2011; SANTOS et al., 2016; LIMA-COSTA et al., 2015;) dos trabalhadores rurais deste estudo, estão representadas na Tabela 0.1.

Tabela 0.1 Distribuição das frequências alélicas da amostra e da população Yorubá.

	ALELO	FREQUENCIA ALÉLICA	FREQUENCIA ALÉLICA (YORUBÁ)
rs 1803274	T	0,18	0,16
	C	0,82	0,84

A frequência de distribuição entre os genótipos, utilizando o modelo aditivo-dominante-recessivo está descrita pela Tabela 0.2.

Tabela 0.2 Frequência de distribuição entre os genótipos nos modelos Aditivos- Dominante e Recessivos

TagSNP	Alelo Associado	Modelo Genético	Alelos	N(%)
rs1803274	C	Aditivo	TT	16(3,9)
			CT	129(31,2)
			CC	268(64,9)
		Dominante	TT	16(3,9)
			CT + CC	397(96,1)
		Recessivo	TT + CT	145(35,1)
			CC	268(64,9)

A atividade de BChE também foi relacionada com os genótipos, porém, não houve diferença estatística entre este parâmetro e o polimorfismo rs1803274, como apresentado na Tabela 0.3.

Tabela 0.3 Associação entre os genótipos nos modelos Aditivos- Dominante e Recessivos e a atividade da BChE.

TagSNP	Alelo Associado	Modelo Genético	Alelos	BChE Normal	BChE Reduzida	Valor de p
rs1803274	C	Aditivo	TT	13(4,0)	0(0)	0,085**
			CT	96(29,8)	8(57,1)	
			CC	213(66,1)	6(42,9)	
		Dominante	TT	13(4,0)	0(0)	1,000*
			CT + CC	309(96,0)	14(100)	
		Recessivo	TT + CT	109(3,9)	8(57,1)	0,088*
			CC	213(66,1)	6(42,9)	

*Teste Exato de Fisher

** Modelo de Regressão Logística Binária

Para o rs1803274, temos que o alelo C foi o mais frequente, sendo que a maior parte dos trabalhadores rurais apresentou este alelo em homozigose (268/64,9%). Achados semelhantes foram vistos em outros estudos na Colômbia e Espanha (SÁNCHEZ et al., 2015; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2005) . A ordem de frequência genotípica em todos estes estudos é de CC>CT>TT, similar aos achados do presente estudo, e que reforçam a hipótese de dominância observada pelo alelo C em todas as populações destes estudos. Sanchez, em seu trabalho com adultos expostos a inibidores de colinesterase na Colômbia, achou em 84% de seus genótipos a presença do alelo C, e demonstrou a relação entre o genótipo e a atividade da enzima, encontrando uma associação significativa ($p < 0,001$) (SÁNCHEZ et al., 2015). Gómez-Martin, em seu estudo na Espanha, usou a população européia (caucasiana) como referência, pelo seu perfil de ancestralidade, e ainda assim encontrou a mesma frequência alélica que o presente estudo (C=0,82; T=0,18) (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2005). Os resultados de frequência alélica encontrados no presente estudo reforçam a hipótese do caráter dominante do alelo C, nas diversas populações estudadas (SÁNCHEZ et al., 2015).

CONCLUSÕES

A maioria dos integrantes desta pesquisa não apresentou o alelo polimórfico para o rs1803274, SNP da BChE, sendo que 64,9% dos genótipos apresentaram apenas o alelo selvagem. Os resultados de frequência alélica encontrados reforçam a hipótese do caráter dominante do alelo C

PERSPECTIVAS

Um estudo de caráter longitudinal poderá expressar melhor esta relação, correlacionando com os valores basais da BChE e estimando a perda de atividade

pós-exposição ao OF. Assim como a análise de SNPs de outros genes candidatos são necessários para entender melhor o fundo genético relacionado a intoxicação por OF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez LH, Medina OM, Gómez G, González CI, Glores-Vargas Ó. Laboratory genetic-based reference values for cholinesterase activity in a Colombian population: A step forward in personalized diagnostics. *Biomédica* [Internet]. 2015;35:20–9. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572015000500003&lang=pt
2. Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett*. 2005;159(1):13–21.
3. Gómez-Martín A, Hernández AF, Martínez-González LJ, González-Alzaga B, Rodríguez-Barranco M, López-Flores I, et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere*. 2015;139:534–40.
4. Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011;6(2).
5. Suarez-Kurtz G, Pena SDJ, Struchiner CJ, Hutz MH. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Front Pharmacol*. 2012;3 NOV(November):1–7.
6. Santos HC, Horimoto AVR, Tarazona-Santos E, Rodrigues-Soares F, Barreto ML, Horta BL, et al. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2016;24(5):725–31. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejhg.2015.187>
7. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871

OUTRAS ATIVIDADES

Os dados coletados na estação de anamnese em formulários eletrônicos foram migrados eletronicamente para planilhas do tipo Microsoft® excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx). Para migração dos dados coletados na estação de coleta de sangue, posteriormente a coleta os valores obtidos foram tabulados em planilha do tipo Microsoft® Excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx) utilizando dupla digitação e posterior “data compare”, desta forma checando a consistência da migração.

Este trabalho foi dividido entre as análises descritivas, análise de variáveis contínuas e categóricas, na qual foram analisados as características sociodemográficas e econômicas (faixa etária, gênero, cor da pele, local de residência, grau de instrução e classe socioeconômica - segundo o Critério de Classificação Econômica Brasil – CCEB, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – ABEP - APÊNDICE C), e genotipagem dos trabalhadores rurais para o SNP estudado.